

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月8日現在

機関番号：17102
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23710080
 研究課題名（和文） 低分子量内分泌かく乱化学物質のオーファン核内受容体結合性の迅速解析
 研究課題名（英文） Swift exploration of the receptor binding characteristics of low molecular weight endocrine disruptors for orphan nuclear receptors
 研究代表者
 劉 曉輝（LIU XIAOHUI）
 九州大学・理学研究院・学術研究員
 研究者番号：60596849

研究成果の概要（和文）：リガンド未知の「オーファン核内受容体」に対して、トレーサーとする標準化学物質がないため受容体結合試験ができず、困難な研究課題となっている。本研究では、複数のヒト核内受容体について、表面プラズモン共鳴法（SPR）を利用した分子間相互作用解析装置 Biacore T100 を用いて低分子量化学物質と核内受容体の結合試験系を確立し、強く結合する化学物質を見出した。そして、放射標識体を用いた受容体結合試験系の構築にも成功し、これまでに全く知られていない化合物が受容体と非常に強く結合することが判明した。

研究成果の概要（英文）：With no radiolabeled standard compound for the receptor-binding assay, it is difficult to make a structure-activity study especially for "orphan nuclear receptor." The SPR method requires no standard compound in receptor assay, and thus in this study, we intended to establish a novel way to perform SPR prior to the ordinary binding assay. By using non-radiolabeled compounds, we carried out SPR to explore the ligands of particular nuclear receptor, and those that bind to the receptor were then utilized for radio-ligand receptor binding assay. In several occasions, we could find out eventually a very specific chemical that strongly binds to a certain important nuclear receptor.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：有害化学物質、蛋白質、脳・神経、生理活性、ビスフェノールA

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究に関連する国内・国外の研究動向

環境化学物質のヒトの健康への有害影響が社会的に懸念され、近年特に、胎児や乳幼児をはじめとする化学物質に対して脆弱な集団を保護するため、ヒト核内受容体 48 種について、すべて有害なシグナル毒性を示す可能性があることが示された。申請者らは、

2006 年秋、胎児や乳幼児に対する低用量での悪影響が懸念されている化学物質・ビスフェノールAが核内受容体の 1 種 ERR γ に天然ホルモン並みに非常に強く結合することを証明した。さらに、米国・国家毒性プログラム NTP によって毒性について詳細に調べべき化学物質としてノミネートされたビスフェノール AF が女性ホルモン受容体 ER α 、ER β と強く結合し、 α 型ではアゴニスト

活性、 β 型ではアンタゴニストとして働く事実を明らかとし、報告した。こうして応募者の研究グループは、化学物質の核内受容体結合性について世界をリードする研究を展開し、全 48 種への検討を加速している。しかしながら、特にオーファン核内受容体については、結合する化学物質があるのか？ 何なのか？ どのような結合様式か？ 等の検討には非常な困難性があり、迅速なアッセイ系の確立が緊要な課題となっている。

(2)着想に至った経緯

申請者の研究グループでは、これまで「センシング抗体法」等により、ヒト 48 種類核内受容体の化学物質のリスク評価に取り組んできた。その中で、ビスフェノールAが $ERR\gamma$ に選択的・特異的に非常に強く結合することを初めて明らかとし、ビスフェノールA/ $ERR\gamma$ の結合体の X 線結晶構造解析にも成功し、さらには、 $ERR\gamma$ に結合する多くのフェノール類を明らかにするなど、次々と新事実を明らかにしてきた。こうして、オーファン核内受容体の 1 種類である $ERR\gamma$ については、結合に関する知見は進んでいるが、他の受容体については、試験系の確立はあまり進んでいない。現在まで、標的核内受容体に対する化学物質の結合度を調べる方法に、放射標識された標準物質を用いる結合試験がある。しかし、天然リガンドが発見されていない「オーファン核内受容体」は、こうした結合試験は適用できない。これを克服するには、標準物質を使わず、受容体と化学物質の相互作用を測定できる試験系が必要である。

こうしたなか、近年、表面プラズモン共鳴を利用した分子間相互作用解析装置が数多く開発されて、DNA-タンパク質、タンパク質-タンパク質、タンパク質-低分子化合物など分子種を選ばずあらゆる測定が可能である。しかも、この装置を用いれば、放射標識リガンドない「オーファン核内受容体」と結合親和性の解析が可能となる。

2. 研究の目的

上記の研究開始当初の背景で述べた通り、内分泌攪乱作用は、化学物質の核内受容体を介したシグナル毒性である。したがって、核内受容体に対する化学物質の結合を測定することは不可欠な研究であり、活性の指標となる標準化合物は必須な分子ツールである。しかし、ヒト核内受容体 48 種類のうち、化学物質の結合性に関する研究が進展しているのは約半数に過ぎず、残りは天然リガンドさえ発見されていない。そこで、本研究では、リガンド未知の「オーファン核内受容体」に

強く結合する化学物質を探索する目的とし、表面プラズモン共鳴を利用した分子間相互作用解析装置を用いて分子量 150~500 の低分子量化学物質の核内受容体結合親和性について解析する。そして、標準化合物となり得る高親和化合物を同定する。

3. 研究の方法

(1) 試験化学物質の選定

試験する化学物質は、現在流通しているものを中心に、ビスフェノール類、フェノール類、フタル酸類、有機スズ類、フラボノイド類、ステロイド類、他の環境ホルモンなどを合わせて、合計 500 種程度の試験化学物質を選定する。それぞれの試験化学物質は 10^{-2} M の DMSO 溶液として調製する。

(2) 核内受容体リガンド結合ドメインタンパク質の発現系構築

試験系を確立ため、それぞれの核内受容体をリガンド結合ドメインと GST タンパク質融合タンパク質として量的に発現・精製する。作製済みのオーファン核内受容体タンパク質発現プラスミドを大腸菌 BL21 株に導入し、GST との融合タンパク質として発現系を構築する。さらに、グルタチオンのアフィニティカラムによりタンパク質を大量に精製する。

(3) ビアコア受容体結合試験系の確立

得られたタンパク質は、ビアコア T100 測定装置のセンサーチップに GST 抗体を介した抗体反応により固定化する。試験の最適な固定化条件を設定するため、様々なタンパク質に対して反応濃度、流速、添加時間、解離時間など、詳細に条件検討を行う。こうした上で、それぞれの受容体タンパク質に対して、現在まで報告された結合化学物質があればそれをコントロールとして、タンパク質の機能性を確認する。無い場合は直接的に解析する。結合が確認された場合、構造要因を細かく変えながら、詳細な構造活性相関解析を実施し、結合性を確認する。さらに、それぞれの受容体に対して、こうした結合試験を実施する。

(4) 化学物質の結合親和性評価

上記で確立した受容体の結合試験系を用いて、精製した各オーファン核内受容体について化学物質 500 種を順次に試験する。解離定数が ~ 500 nM 以下の強い結合性を示す化学物質をリストアップする。

(5) トリチウム標識化学物質を用いた受容体結合試験系の構築

ピアコアを用いた試験によって同定されたリード化合物のトリチウム標識体を用いて、受容体結合試験系を構築する。受容体結合試験系を確立した後、リード化合物の構造を基本として、これより強く結合する化合物を探索・同定する。

4. 研究成果

(1) オーフアン核内受容体リガンド結合ドメインタンパク質の量的発現と精製

申請者らはこれまでの様々な研究により、48 種類核内受容体のリガンド結合ドメイン (LBD) の発現プラスミド作製を完了した。そこで、既に作製済みの合計 20 種のオーファン核内受容体 LBD 発現プラスミドを大腸菌 BL21 株に導入し、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として発現した。さらに、グルタチオングルタチオンのアフィニティカラムにより試験系を用いられるタンパク質を大量に精製した。その結果、20 種のうち、11 種の受容体について、非常に高純度な (95%以上) の受容体タンパク質を得ることができた。

(2) ピアコアを用いた受容体の結合試験系の確立および化学物質の結合親和性の評価

まず、(1)で得られた GST 融合タンパク質を用いて、ピアコア T100 測定装置のセンサーチップに GST 抗体を介した抗体反応により固定化し、各オーファン核内受容体に対して、結合試験の最適な条件を確立した。

次いで、それぞれのオーファン核内受容体について、申請者らの研究室に既存のトリチウム標識体化合物の非標識体および放射標識体を購入可能な化学物質から、優先的に受容体との結合性を確認し、化学物質と受容体の結合親和性を評価した。その結果、ERR α 、ERR β 、LRH-1、Rev-erb β 、COUP-TF1 の 5 種の受容体については、結合解離定数 (K_D) が \sim 500 nM 以下の結合性を示す化学物質の同定に成功した。これらは、これまでに全く知られていない化合物群で、初めて結合性が明らかとなった。

(3) トリチウム標識体を用いた受容体結合試験系構築および化学物質スクリーニング

ピアコアを用いた結合試験系によって同定された化学物質のトリチウム標識体を用いて、受容体結合試験系の構築を試みた。その結果、LRH-1 受容体の結合試験系の構築を成功した。そこで、競合結合試験系を確立し

た後、まず、約 100 種の化学物質について、スクリーニングした。その結果、これまで全く知られてない化合物が LRH-1 受容体と非常に強く結合することが判明した。引き続き、約 200 種についてスクリーニングし、この結果を確認すると共に、結合性の化学物質に報告されている細胞膜受容体に対するアンタゴニストについて試験したところ、これらアンタゴニストは核内受容体には結合せず、新規な結合様式で相互作用することが判明した。また、同様な結果が複数の核内受容体で得られつつあり、これらは本研究の戦略的な迅速解析法がきわめて妥当なものであることを証明した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. 下東康幸、劉 暁輝、松島綾美：ビスフェノールの核内受容体応答の分子メカニズム。 *Endocrine Disrupter News Letter*, (査読無) **15 (4)**, 5 (2013).
2. Matsuyama, Y., Liu, X., Nishimura, H., Matsushima, A., Nose, T., and Shimohigashi, Y.: Bisphenol-binding pocket of constitutively active nuclear receptor car: docking modeling for close-packing. *Peptide Science* 2012, (査読有) 401-402 (2013).
3. Matsuo, A., Nakamura, M., Takeda, Y., Matsuyama, Y., Sumiyoshi, M., Liu, X., Matsushima, A., Shimohigashi, M., and Shimohigashi, Y.: The impact of bisphenol A-feeding on the *Drosophila* neuropeptide PDF mRNA structure. *Peptide Science* 2012, (査読有) 75-76 (2013).
4. Liu, X., Matsushima, A., Nakamura, M., Costa, T., Nose, T., and Shimohigashi, Y.: Fine spatial assembly for construction of the phenol-binding pocket to capture bisphenol A in the human nuclear receptor ERR γ . *Journal of Biochemistry*, (査読有) **151**, 403-415 (2012). DOI: 10.1093/jb/mvs008

[学会発表] (計 52 件)

1. 劉 暁輝、巢山慶太郎、志岐潤一、松島綾美、野瀬 健、下東美樹、下東康幸：ハロゲン含有ビスフェノールのエストロゲン受容体 α 型と β 型における異なる転写活性化. リスクサイエンス研究フォーラム 2013、2013 年 3 月 11 日、

福岡大学セミナーハウス。

2. 佐々木彩也香、劉 曉輝、松島綾美、野瀬 健、下東康幸：オーファン核内受容体 LRH-1 はロイコトリエン受容体である。リスクサイエンス研究フォーラム 2013、2013 年 3 月 11 日、福岡大学セミナーハウス。
3. 劉 曉輝、巢山慶太郎、志岐潤一、松島綾美、野瀬 健、下東美樹、下東康幸：エストロゲン受容体 α 型と β 型へ異なる転写活性化を示すハロゲン含有ビスフェノール。環境ホルモン学会 第 15 回研究発表会、2012 年 12 月 18-19 日、東京大学山上会館。
4. 佐々木彩也香、劉 曉輝、松島綾美、野瀬 健、下東康幸：オーファン核内受容体 LRH-1 に対する環境化学物質のスクリーニング。環境ホルモン学会 第 15 回研究発表会、2012 年 12 月 18-19 日、東京大学山上会館。
5. 劉 曉輝、巢山慶太郎、松島綾美、野瀬 健、下東康幸：ハロゲン含有ビスフェノールのエストロゲン受容体サブタイプ特異的転写活性： α -アゴニズムおよび β -アンタゴニズム。第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 14-16 日、福岡国際会議場、マリンメッセ福岡。
6. 佐々木彩香、劉 曉輝、松島綾美、野瀬 健、下東康幸：オーファン核内受容体 LRH-1 に対する SPR および結合試験系によるリガンド探索。第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 14-16 日、福岡国際会議場、マリンメッセ福岡。
7. 日高大貴、劉 曉輝、池田伸、西村裕一、松島綾美、下東康幸：核内受容体 NGFI-B のリガンド結合ドメインタンパク質の発現と精製。第 49 回化学関連支部合同九州大会、2012 年 6 月 30 日、北九州市国際会場。
8. 劉 曉輝、巢山慶太郎、松島綾美、野瀬 健、下東康幸：ハロゲン含有ビスフェノール類のエストロゲン受容体 ER α および ER β でのホルモン活性特性。平成 24 年度日本生化学会九州支部例会、2012 年 5 月 26-27 日、福岡大学 A 棟。
9. 佐々木彩也香、劉 曉輝、松島綾美、野瀬 健、下東康幸：オーファン核内受容体 LRH-1 に対する高効率結合試験系の確立。平成 24 年度日本生化学会九州支部例会、2012 年 5 月 26-27 日、福岡大学 A 棟。
10. 劉 曉輝、下東康幸：内分泌攪乱候補化学物質・ビスフェノール AF はヒト・女性ホルモン受容体 α 型と β 型で活性化メ

カニズムが異なる。リスクサイエンス研究フォーラム 2012、2012 年 3 月 13 日、福岡大学セミナーハウス。

11. 佐々木彩也香、劉 曉輝、松島綾美、野瀬 健、下東康幸：肝臓オーファン核内受容体 LRH-1 に対する高効率結合試験系の構築。リスクサイエンス研究フォーラム 2012、2012 年 3 月 13 日、福岡大学セミナーハウス。
12. 劉 曉輝、松島綾美、中村将行、野瀬 健、下東康幸：エストロゲン関連受容体 γ 型・ERR γ へのビスフェノール A の結合における受容体の必須構造要因。第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 21-24 日、国立京都国際会館。
13. 劉 曉輝、松島綾美、岡田浩幸、下東康幸：Distinction of the binding modes for human nuclear receptor ERR γ between bisphenol A and 4-hydroxytamoxifen. 第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 21-24 日、国立京都国際会館。
14. 劉 曉輝、松島綾美、中村将行、野瀬 健、下東康幸：エストロゲン関連受容体 γ 型・ERR γ へのビスフェノール A の結合における受容体の必須構造要因。第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 21-24 日、国立京都国際会館。
15. 佐々木彩香、劉 曉輝、松島綾美、野瀬 健、下東康幸：SPR 分子間相互作用測定によるヒト・オーファン核内受容体 LRH-1 の低分子リガンドの探索。第 48 回化学関連支部合同九州大会、2011 年 7 月 9 日、北九州市国際会場。
16. 劉 曉輝、縄司 奨、松島綾美、野瀬 健、下東康幸：ヒト・レチノイン酸受容体 (RAR) に結合する化学物質の探索。平成 23 年度日本生化学会九州支部例会、2011 年 5 月 21-22 日、久留米大学医学部築水会館。

[その他]

ホームページ等

<http://lsfb.scc.kyushu-u.ac.jp>

<http://RSRC.scc.kyushu-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

劉 曉輝 (XIAOHUI LIU)

九州大学・大学院理学研究院・学術研究員
研究者番号：60596849

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし